

Ononis fajok fitokémiai jellemzése

Doktori tézisek

Gampe Nóra

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Béni Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kursinszki László, Ph.D., egyetemi docens
Hivatalos bírálók: Dr. Mazákné Kraszni Márta, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Csupor Dezső, Ph.D., egyetemi docens
Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Ledniczkyné Lemberkovics Éva, Ph.D. ny. egyetemi tanár
Dr. Hajdú Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Abrankó László, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2019

Bevezetés

A természetes eredetű vegyületek növényi drogok formájában történő alkalmazása az emberiség történelmével egyidős, és napjainkban is népszerű. Számtelen növényi kivonat bizonyult eredményesnek különböző megbetegedések kezelésében vagy megelőzésében, a hatások háttérében álló molekulák a legtöbb esetben azonban még ismeretlenek. A fitokémiai és fitoanalitikai mérések pont ezt a kérdéses területet veszik górcső alá, és segítségével azonosíthatóvá válnak az egészségre előnyös növényi kivonatok hatásért felelős molekulái. A fitoanalitika tárgya azonban túlmutat az eredendő kíváncsiság kérdésein – Mi ez és miért így működik? – és eszközt nyújt a növényi drogok és a belőlük készülő termékek minőségének szabályozásához és ellenőrzéséhez. Annak ismeretében, hogy mely vegyületek a legelőnyösebbek gyógyászati szempontból, biotechnológiai módszerekkel a növények másodlagos anyagcsere-termékeinek eloszlása és mennyisége finomhangolható, így a célvegyületek kinyerése gazdaságosabbá válhat. Továbbá, a hatást hordozó molekulák szerkezetének felderítésével új félszintetikus, a hatás-szerkezet összefüggés szempontjából optimalizált molekulák születhetnek.

A tövises iglice (*Ononis spinosa* L., 1. ábra) és a mezei iglice gyökere (*Ononis arvensis* L., 2. ábra) jó példái azon növényi drogoknak, amelyeket a népgyógyászat már évszázadok óta alkalmaz és a gyógyászati felhasználás helyességét *in vivo* tesztekkel is alátámasztották, azonban a hatásokért felelős vegyületek ismeretlenek. Az iglice fajok a pillangósvirágúak családjába tartoznak (Leguminosae), elterjedtek Európában és a Mediterrán térségben. A tövises iglice gyökér vizelethajtó hatása már az Ókor óta ismert és a gyökérdrog több Gyógyszerkönyvben is hivatalos. Napjainkban több tövises iglicéből készült termék is elérhető a piacon, például gyógyteák vagy alkoholos kivonatok formájában, más, szintén vizelethajtó hatású növényvel kombinálva. A növényt belsőlegesen elsősorban vizelethajtásra, húgyúti fertőzések kezelésére és vesehomok, vesekő kezelésére alkalmazzák. A vizelethajtó hatást állatkísérletekkel is igazolták, azonban a hatásért felelős vegyületek ismeretlenek. Az utóbbi évtizedben végzett *in vivo* és *in vitro* kísérletek alapján igazolták továbbá antioxidáns, fájdalomcsillapító, antimikrobiális, gyulladásgátló és sebgyógyító hatását is.

Az iglice fajok legfontosabb vegyületei az izoflavonoidok (3. ábra) és ezek különböző származékai, de megtalálhatók benne fitoszterolok, aromás savak, kis mennyiségű illóolaj, kumarinok, flavonoidok és egy speciális triterpén, az α -onocerin is. Az izoflavonoidok leginkább fitoösztrogén tulajdonságukról ismertek, amely a szerkezeti hasonlóságon alapul. Emiatt fontos szerepet töltenek be a hormonfüggő daganatok, csontritkulás, szív-érrendszeri megbetegedések és civilizációs betegségek, mint a metabolikus szindróma vagy a policisztás

ovárium szindróma kialakulásának megelőzésében. Az előbb említett értékes biológiai hatások miatt a magas izoflavonoid tartalmú növények, mint a szója vagy a vörös here az érdeklődés középpontjába került, azonban az iglice fajok régre visszanyúló felhasználása során nem figyelték meg ezeket az előnyös tulajdonságokat. Emiatt célunk volt a tövises iglice és mezei iglice fajok és a belőlük biotechnológiai úton előállított hairy root kultúrák izoflavonoid profiljának minél részletesebb megismerése.

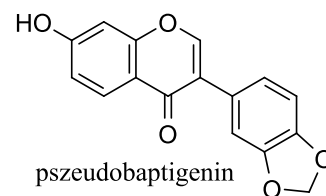
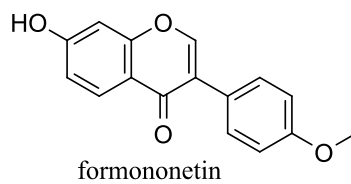


1. ábra: *Ononis spinosa* L.

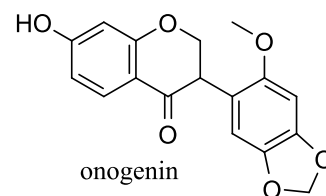
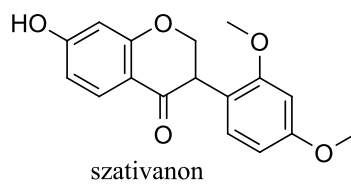


1. ábra: *Ononis arvensis* L.

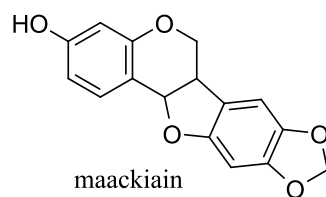
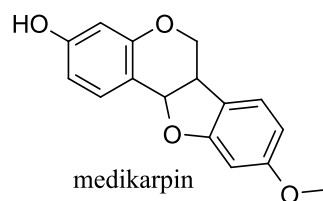
Izoflavonok



Izoflavánonok



Pterokarpánok



3. ábra: A hat legfontosabb, *Ononis* fajokban található izoflavonoid aglikon szerkezete

Célkitűzések

Az iglice fajok fitokémiájával foglalkozó irodalmi források száma korlátozott és ezek is főleg azon vegyületek kimutatására és mennyiségi meghatározására szorítkoznak, amelyek elérhetők kereskedelmi standardok formájában, azonban a többi izoflavonoid vegyületről és ezek származékairól nincs információ. Emiatt doktori munkám elsődleges célja a Magyarországon honos iglice fajok izoflavonoid profiljának lehető legrészletesebb vizsgálata volt minőségi és mennyiségi szempontokból. Annak ellenére, hogy *in vitro* kultúrákat mindkét fajból előállítottak már, ezek izoflavonoid tartalma szintén ismeretlen volt eddig. Ezek alapján céljaink az alábbiak voltak:

1. Az *O. spinosa* és *O. arvensis* fajok izoflavonoid profiljának feltárása és szerkezeti információ szerzése HPLC-DAD-ESI-MS/MS és UHPLC-DAD-ESI-Orbitrap-MS/MS módszerekkel.
2. Azon vegyületek esetében, amelyeknél a tömegspektrometriás vizsgálat nem nyújtott egyértelmű szerkezeti információt, célunk volt izolációs módszer fejlesztése és izoláció után elemzésük ortogonális spektroszkópiás módszerekkel.
3. További célunk volt mennyiségi információt nyerni az *O. spinosa* és *O. arvensis* fajok, illetve a belőlük előállított hairy root kultúrák izoflavonoid tartalmáról, melyhez HPLC-DAD módszert kívántunk alkalmazni.

Anyagok és módszerek

A növényi mintákból készült vizes-metanolos kivonatokban először HPLC-DAD-ESI-MS/MS és UHPLC-DAD-ESI-Orbitrap-MS/MS módszerekkel vizsgáltuk a célvegyületek jelenlétét és szerkezetét. Pozitív ionizációs módban az izoflavonoidok ún. retro Diels-Alder reakció révén olyan fragmens ionokat képeznek, amelyek segítik a konstitúciós izomer izoflavonoid származékok megkülönböztetését is. Ezt kiegészítve a nagyfelbontású tömegspektrometriás mérésekkel, a fragmensek és az anyaiionok elemösszetétele számítható és az izobár szerkezetek is elkülöníthetők.

Abban az esetben, amikor új szerkezetek vagy ismeretlen vegyületek azonosítása a feladat, ahol nincs lehetőség a MS spektrumok összehasonlítására, az NMR spektroszkópia alkalmazása megkerülhetetlen. Ennek segítségével megkülönböztethetők az izoflavonoidok és flavonoidok konfigurációs izomerei, továbbá meghatározhatók a glikozidok és észterek kapcsolódási helyei. A módszer korlátja, hogy az NMR mérésekhez viszonylag nagy mennyiségű tiszta anyag szükséges, amelyhez preparatív módszerek fejlesztése elengedhetetlen.

Az MS mérések segítségével nem azonosítható komponensek izolációját különböző módszerek alkalmazásával végeztük, amely magába foglalta flash kromatográfia és preparatív nagyhatékonyságú kromatográfia és kationcserélő gyanta felhasználását is.

Annak érdekében, hogy a biológiai hatás és a növény tartalmi anyagai között összefüggést lehessen felállítani, mennyiségi információkra is szükség van. Mivel az *O. spinosa* és *O. arvensis* mintákban az izoflavonoidok sokféle származék formájában vannak jelen, ezért ezeknek külön-külön meghatározása nehézségekbe ütközött. Emiatt enzimatisz hidrolízist alkalmaztunk az izoflavonoid glikozidok aglikonná alakítására, amelyet alátámaszt számos irodalmi adat, melyek szerint a vegyületek aglikon formájában hasznosulnak. A tövises, illetve mezei iglice gyökér kivonatok, és a két faj *in vitro* hairy root kultúráit HPLC-DAD módszerrel vizsgáltuk külső kalibrációt alkalmazva. A módszer validálása során meghatároztuk a linearitási tartományt, a kimutathatósági és meghatározhatósági határt, illetve a mérésen belüli és mérések közötti pontosságot és precizitást.

Eredmények

1. Az izoflavon formononetin, pszeudobaptigenin és a pterokarpán medikarpin és maackiain jelenlétét glükozidjaikkal együtt már leírták *Ononis* fajokban, ezért azonosításuk elvégezhető a fragmentációs profil és az elemösszetétel ismeretében. A korábbi *Ononis* közleményekben szereplő genisztein, daidzein és biochanin A származékok jelenlétét a növényekben azonban nem sikerült igazolnunk a tömegspektrometriás adatok alapján. A kuneatint és 2'-metoxi-formononetint elsőként írtuk le iglice fajokban. Azonosításuk alapjául az analóg vegyületek (pszeudobaptigenin és formononetin) fragmentációs profiljához való nagyfokú hasonlóság szolgált.

2. Mivel onogenint és szativanont, illetve glikozidjaikat korábban nem azonosították a vizsgált fajokban, illetve nem volt elérhető referencia a MS fragmentáció összehasonlításához, ezért ezeket a vegyületeket izoláltuk és szerkezetüket NMR mérések segítségével határoztuk meg.

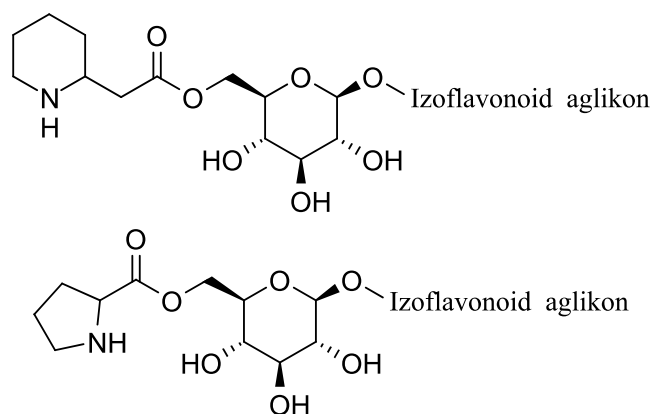
3. A kalikozin és kalikozin D helyzeti izomerek, amelyek csak egy metoxi-csoport helyében térnek el. Mivel csak MS mérések alkalmazásával nem adódott szignifikáns különbség a két vegyület viselkedésében, ezért standard vegyületet alkalmaztunk az aglikonok retenciós időn alapuló azonosítására. A glükozid- és a glükozid-malonát származékot izoláltuk, majd NMR mérések alapján azonosítottuk az aglikon típusát.

4. A puerol származékok speciális szerkezetű fenolos laktonok amelyek többféle metoxilált és glikozilált formában fordulnak elő a természetben. Az iglice fajokban található szerkezetek vizsgálatához a puerol származékok két-két képviselőjét (páronként egy aglikon és egy glükozid) izoláltuk, majd NMR mérések alapján megállapítottuk, hogy a növény puerol A-t és ennek 2'-*O*-glükozidját, illetve klitorienolakton B-t és ennek 4'-*O*-glükozidját tartalmazza.

5. A mintákban található egyik legnagyobb alapterületű kromatográfiai csúcs fragmentációs spektruma nem egyezett egyik izoflavonoid alaptípusával sem, így ezt a vegyületet szintén izoláltuk és szerkezetét maltol-glükozid hidroximetil-glutarát észterként (likoagrozd B) írtuk le. Ezt a vegyületet először azonosítottuk a nemzetségben.

6. A HPLC-ESI-MS/MS mérések során pozitív ionizációs módban sikerült detektálnunk néhány igen intenzív csúcsot, amelyek a DAD kromatogramokon csak alig voltak megfigyelhetők. A *N*-szabály alkalmazásával és fragmentációs spektrumuk figyelembevételével a vegyületek *N*-tartalmú izoflavonoid származékok kétféle típusának bizonyultak. Mivel korábban nem írtak le alkaloid- vagy *N*-tartalmú származékokat a növény gyökerében, ezért izolációs módszert fejlesztettünk a nagyobb mennyiségben

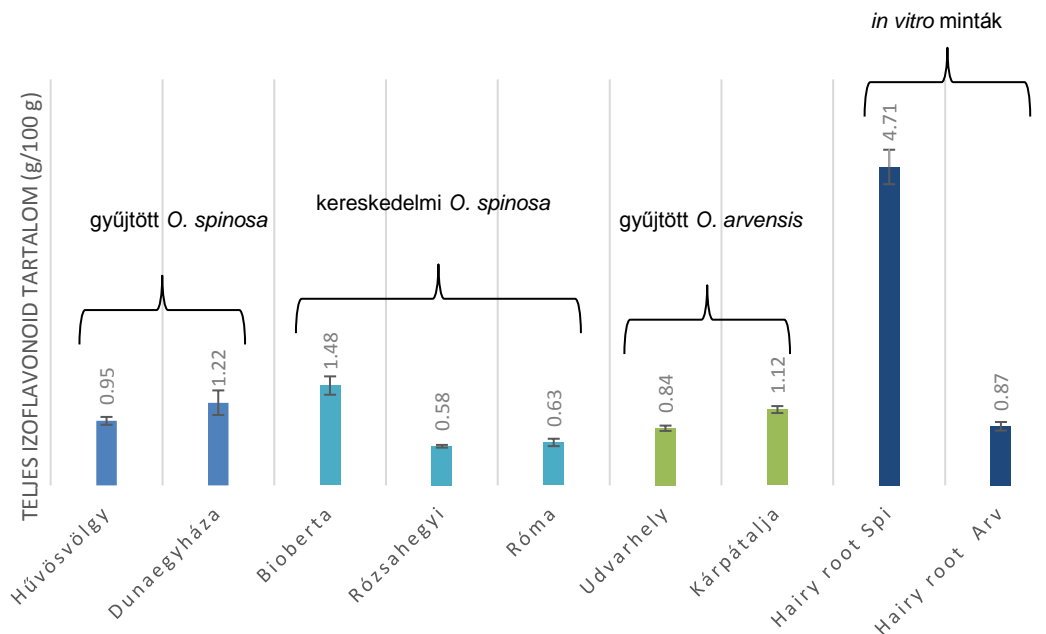
jelenlévő vegyületsorozat kinyerésére. Az NMR mérések alapján ezek izoflavonoid glükozidok homopipekolinsav észtereinek bizonyultak. Az MS/MS mérések alapján az ismeretlen vegyületek másik csoportja ezek homológja, amelyek eggyel kevesebb CH₂ egységet tartalmaznak a béta-aminosav molekuláris részben (4. ábra). A növényi mintákban azonban ezek a származékok olyan alacsony mennyiségben voltak jelen, hogy izolálásukra nem adódott mód, így jelenlétüket indirekt módszer alkalmazásával bizonyítottuk. Ehhez a *N*-tartalmú észtereket keverékét elhidrolizáltuk, így felszabadítva a kétféle aminosavat, majd ezek viselkedését vetettük össze standard anyagokéval HPLC-ESI-MS/MS rendszerben. Ennek segítségével először sikerült igazolnunk a homopipekolinsav és homoprolin jelenlétét a Leguminosae családban.



4. ábra: Izoflavonoid glükozidok homopipekolinsav- és homoprolin észterének szerkezete

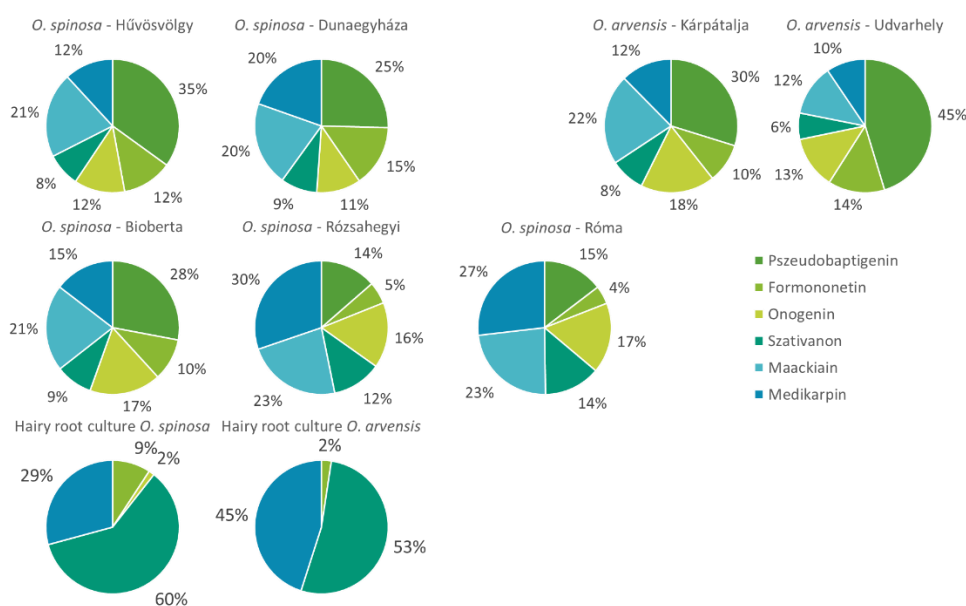
7. Mivel az izoflavonoidok glükozidok és glükozid-malonátok formájában egyaránt megtalálhatók a növényi mintákban, ezért a kvantitatív mérések előtt a mintaösszetétel egyszerűsítésére volt szükség. Az irodalomban a savas hidrolízis a legelterjedtebb módszer a glikozidos kötés hasítására, esetünkben azonban ez nem volt alkalmazható, mivel a pterokarpánok bomlását is okozta. Végezetül a növény saját glükozidáz enzimkészletét alkalmaztuk a minták hidrolízisére.

8. Az optimalizált HPLC-DAD módszer alkalmazásával három kereskedelmi *O. spinosa* minta, két-két szabadban gyűjtött *O. spinosa* és *O. arvensis* gyökérdrog, valamint mindkét faj *in vitro* hairy root kultúráinak izoflavonoid tartalmát vizsgáltuk (5. ábra). A módszert előzetesen validáltuk, melynek során az ICH, EMEA és az FDA irányelveit egyaránt figyelembe vettük. Először határoztuk meg az *Ononis* fajokban található 6 izoflavonoid mennyiségi viszonyait.



5. ábra: *O. spinosa* és *O. arvensis* minták összesített izoflavonoid tartalma

9. Elsőként vizsgáltuk az *Ononis* fajokból előállított hairy root kultúrák izoflavonoid tartalmát. Eredményeink alapján elmondható, hogy ezek a minták szignifikánsan különböznek enzimatikus működés és bioszintetikus profil szempontjából a szabad földben növekedett mintáktól. Ennek legfőbb bizonyítéka, hogy az *in vitro* kultúrák csak metoxilált izoflavon, izoflavanon és pterokarpán származékokat termeltek, metiléndioxi szubsztituenssel rendelkezőket nem (6. ábra). Továbbá, az *O. spinosa* hairy root kultúra kiemelkedően magas izoflavonoid termelést mutatott (5. ábra).



6. ábra: Izoflavonoidok aglikonok szerinti megoszlása a különböző mintákban

Következtetések

Az *O. spinosa* és *O. arvensis* kivonatainak fitokémiai vizsgálata során összesen 47 vegyületet sikerült azonosítanunk. Ezek többségében izoflavonoidok glükozidjai, glükozid-malonátjai és aglikonai voltak, azonban pár speciális fenolos laktont és egy maltol glikozid származékot is leírtunk a mintákban. Kalikozin, szativanon, onogenin és származékaik jelenléte elsőként került igazolásra az *O. spinosa* mintákban, míg az *O. arvensis* kivonataiban pszeudobaptigenint, kalikozint és szativanont nem említett eddig a szakirodalom. A kalikozin tartalom a bioszintetikus útvonal segítségével is igazolható, mivel a kalikozin köztiterméként szolgál a formononetin és a pszeudobaptigenin között. A 2'-metoxi-izoflavonok jelenlétére szintén a bioszintézis folyamata adhat választ. Geniszteint, daidzeint és biochanin A-t nem sikerült kimutatnunk, azonban ezen vegyületek prekuzora a naringenin lenne, míg a többi leírt vegyület likviricigeninből képződik.

A béta-aminosav észtereket, mint új típusú izoflavonoid származékokat elsőként sikerült jellemeznünk. A homopipekolinsavat leírták korábban *Lycopodium* fajokban, mint az alkaloidszintézis köztitermékét. A homoprolint pedig *Asteraceae* fajokból izolálták korábban, mint a pirrolizidin alkaloidok előanyagát. Együttes előfordulásuk azonban eddig nem volt ismert és bioszintetikus eredetükre sem találtunk magyarázatot a *Leguminosae* családban. Funkciójuk egyelőre bizonytalan. Szolgálhatnak egyrészt nitrogén raktárként vagy mérgező aminosav homológokként védhetik a növényt a kártevőktől.

Tekintve, hogy átlagosan a szabadföldi minták össz-izoflavonoid tartalma 0.97 g/100g volt, az izoflavonoidok gazdag forrásának tekinthetők. Tekintettel arra, hogy az izoflavonoid profil a szója és vörös here készítményektől igen eltérő volt, a fitoösztrogén hatásra becsléseket tenni igen nehéz. Az izoflavonok mellett (melyek megtalálhatók az előbb említett növényekben is), az *Ononis* minták igen gazdagok voltak izoflavonokban és pterokarpánokban, amelyek sokkal ritkábban előforduló vegyületeknek számítanak fitokémiai szempontból. Ráadásul az *O. spinosa* hairy root kultúrák gazdag forrásai ezen vegyületek metoxilált formáinak, megkönnyítve azok kinyerését.

Saját publikációk jegyzéke:

A publikáció témájában megjelent közlemények

Gampe N, Darcsi A, Lohner S, Béni S, Kursinszki L. (2016) Characterization and identification of isoflavonoid glycosides in the root of Spiny restharrow (*Ononis spinosa* L.) by HPLC-QTOF-MS, HPLC-MS/MS and NMR. J Pharmaceut Biomed, 123: 74-81.

Gampe N, Darcsi A, Kursinszki L, Béni S. (2018) Separation and characterization of homopipelic acid isoflavonoid ester derivatives isolated from *Ononis spinosa* L. root. J Chrom B, 1091: 21-28

Gampe N, Darcsi A, Nagyné Nedves A, Boldizsár I, Kursinszki L, Béni S. (2018) Phytochemical analysis of *Ononis arvensis* L. by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. J Mass Spec

Egyéb közlemények

Addotey JN, Lengers I, Jose J, Gampe N, Béni S, Petereit F, Hensel A: Isoflavonoids with inhibiting effects on human hyaluronidase-1 and norneolignan clitorienolactone B from *Ononis spinosa* L. root extract. Fitoterapia, 130:169-174